Untersuchungen zur Spezifität der Antistreptolysinreaktion

INAUGURALDISSERATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Michael Mohm

Saarbrücken

1973

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes Homburg (Saar)
Direktor: Prof. Dr. Dr. Dipl.-Chem. W. Zimmermann

Untersuchungen zur Spezifität der Antistreptolysinreaktion

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Michael M o h m

Dekan: Prof. Dr. G. A. Jutzler
Referent: Prof. Dr. med. R. Wigand

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Prüfung wurde am 30.10.73 abgelegt.

Einleitung:

Die Antistreptolysinreaktion (ASR) ist in der Rheumadiagnostik zu einem unentbehrlichen Test geworden, zumal es heute als gesichert gilt, daß das rheumatische Fieber eine Zweitkrankheit als Folge einer vorausgegangenen Infektion mit ß-hämolysierenden Streptokokken darstellt. Das Streptokokkentoxin Streptolysin O (SL), ein sauerstoffempfindliches Fermentprotein, besitzt Antigeneigenschaften und regt die Bildung eines Antikörpers an (Antistreptolysin O, ASL), der in der ASR methodisch gut erfaßbar ist. Die ASR ist eine weitgehend spezifische Antigen-Antikörperreaktion, die einen indirekten Nachweis einer überstandenen oder bestehenden Infektion mit ß-hämolysierenden Streptokokken der Gruppen A, C und G liefert. Die ASR wurde 1932 von TODD beschrieben und wird seitdem als diagnostisches Hilfsmittel immer mehr benutzt. Da das SL hämolysierende Eigenschaften besitzt, verhindert sein spezifischer Antikörper, das ASL, die durch SL mögliche Hämolyse. Es wird in einer Titerbestimmung die Serumverdünnung festgestellt, bei der die Hämolyse gerade beginnt, und das ASL in Titereinheiten je ml quantitativ nachgewiesen. TODD hat auch die international gültige Antistreptolysineinheit (ASE) geschaffen, und zwar stellt diejenige ASL-Menge, die eine SL-Einheit zu neutralisieren vermag, eine ASE dar. Ein hoher Antistreptolyintiter (AST) ist für die Diagnose eines rheumatischen Fiebers oder eines Streptokokkeninfektes ausschlaggebend. Der Anstieg des AST liegt im allgemeinen 1 - 4 Wochen nach der

Vorkrankheit (KÖHLER, 1963). Bei Tonsillitis wird das Maximum früher erreicht, bei rheumatischem Fieber ist der Antikörperanstieg um etwa zwei Wochen verzögert (ROTHBARD u. a., 1948).

Wer sich eingehend mit dem Aussagewert der ASR befaßt, kennt aber auch die Probleme der unspezifisch erhöhten AST und die daraus möglichen Gefahren diagnostischer Fehlschlüsse. Diese unspezifisch erhöhten AST wurden schon 1948 von PACKALÉN beschrieben, und zwar bei bakteriell verunreinigten Sera sowie bei ikterischen und alkali- und säurebehandelten Sera. OKERBLOM und Mitarbeiter (1950) sowie TEICHMANN (1956) stellten unspezifische AST-Erhöhungen auch bei Hepatitisseren fest. Bei experimentellen bakteriellen Infektionen von Serum fand RUDOLPH 1962, daß es in praktisch allen Spezies Stämme gibt, die keine Bildung von SL-Inhibitoren bewirken. Es muß also nicht jedes bakteriell verunreinigte Serum einen unspezifisch erhöhten AST aufweisen. Als Ursache dieser unspezifischen Titersteigerungen werden Serumlipoide angesehen. Verschiebungen im Lipid-Protein-System der Lipoproteide wirken als unspezifisches Inhibitorsystem, das die enzymatische Aktivität des SL beeinflußt (SCHEIFFARTH u.a., 1964, WINBLAD 1966). Vor allem Cholesterin und Phosphatide nehmen hierbei eine Schlüsselstellung ein, indem die Phosphatide -je nach Mischungsverhältnis- die Wirksamkeit des Cholesterins ganz erheblich steigern (PETERSEN 1966). Im Lauf der letzten Jahre

wurden mehrere Verfahren ausgearbeitet, die die ß-Lipoproteide und teilweise auch die α_1-Lipoproteide eliminieren.

In dieser Arbeit wurden drei Verfahren näher untersucht, und zwar die Dextransulfatmethode nach BURSTEIN und SAMAILLE (1958) (DS), die Heparinmethode nach MANN u. a. (1967) (Hep) und die Fällung mit Isoamylalkohol nach BADIN und BARILLEC (1969) (Iso). Es interessierte uns, wieweit diese drei Methoden bei der ASR zu gleichen oder unterschiedlichen Resultaten führen.
Die DS-Methode ist schon seit 1958 eingeführt und hat sich in der Praxis bewährt, die Hep-Methode wurde bei der ASR noch nicht angewendet.
Ebenso wurde das vor einigen Jahren von den Behringwerken entwickelte Latex-ASL-Reagenz (Polystyrol-Latex-Partikel beladen mit SL) mit der Frage untersucht, ob es zur Unterscheidung von spezifisch und unspezifisch erhöhten AST dienen kann.

Material und Methodik

Antistreptolysintest:

Das zu untersuchende Patientenserum kommt für 3o Minuten in ein Wasserbad von 56 °C, um hämolysierende Komponenten zu inaktivieren. Dann stellt man eine Serumverdünnung 1 : 5o folgendermaßen her: o,1 ml inaktiviertes Patientenserum + 4,9 ml ASL-Puffer pH 7,3. In einen Ständer stellt man 7 Röhrchen. Das erste bleibt ohne Puffervorlage, in das zweite bis siebte Röhrchen pipettiert man je o,5 ml Puffer. Aus der Vorverdünnung 1 : 5o nimmt man nun 1 ml und gibt davon o,5 ml ins erste und o,5 ml ins zweite Röhrchen. Nach Mischen wird aus dem zweiten Röhrchen o,5 ml ins dritte Röhrchen überpipettiert, aus dem dritten o,5 ml ins vierte usw. Man erhält so eine Verdünnungsreihe von 1 : 5o bis 1 : 3.2oo.

Für die Antigen-Antikörper-Reaktion wird der Inhalt eines Fläschchens SL (Streptolysin-O-Reagenz der Behringwerke) in 5 ml Phosphatpuffer pH 7,3 aufgelöst. 1 ml dieser Lösung wird in einem Reagenzglas mit 1o,5 ml ASL-Puffer und 1 ml Na-thioglycolatlösung (als Reduktionsmittel) verdünnt. Nach 1o Minuten ist die Streptolysinlösung (3,2 E/ml) gebrauchsfertig.

In alle sieben Röhrchen der Verdünnungsreihe gibt man o,5 ml dieser mit Reduktionsmittel aktivierten SL-Lösung, mischt gut durch und läßt das Gemisch 25 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubieren.

Nachdem die Antigen-Antikörper-Reaktion bei 37 °C im Was-

serbad abgelaufen ist, führt man die Hämolysereaktion durch, indem man zu jedem Röhrchen o,25 ml einer 2%igen Hammelerythrozytensuspension gibt, schüttelt gut durch und stellt die Röhrchen wieder für 45 Minuten ins Wasserbad. Es wird die Serumverdünnung festgestellt, bei der die Hämolyse gerade beginnt, man schätzt die 5o%ige Hämolyse ab, aus der sich die gesuchte Höhe des AST ergibt.

Streptolysin O + Hammelerythrozyten = Hämolyse

Streptolysin O
+ Antistreptolysin O + Hammelerythrozyten = keine Hämolyse

Dextransulfat-Methode:

Diese Methode wurde 1958 von BURSTEIN und SAMAILLE beschrieben und mit ihr werden die ß-Lipoproteide insgesamt und die α_1-Lipoproteide teilweise eliminiert. Es wurden eine 4%ige Destransulfatlösung (Sodium-Dextran-Sulfate 5oo von Pharmacia Uppsala, 4 g DS + 9o ml Aqua dest, 3o' bei 11o °C autoklaviert) und eine 1 M $CaCl_2$-Lösung verwandt.

o,5 ml inaktiviertes Patientenserum wurden mit o,o2 ml der DS-Lösung und mit o,1 ml der 1 M $CaCl_2$-Lösung versetzt, eine Stunde stehengelassen und dann scharf zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde die ASR durchgeführt.

Heparin-Methode:

MANN und andere verwendeten 1967 diese Methode bei der Hämagglutination-Hemmung mit Reoviren. Sie wurde von BURSTEIN beschrieben und von LEVY verändert (MANN u. a., 1967). Zu o,5 ml inaktivierten Patientenserums wurden o,o5 ml einer 1 M $MnCl_2$-Lösung und o,o2 ml Heparinlösung (Upjohn, 5.ooo Einheiten pro ml) gegeben. Nachdem diese Lösung eine Stunde gestanden hatte, wurde zentrifugiert und der Überstand für die ASR verwandt.

Isoamyl-Methode:

BADIN und BARILLEC (1967) geben an, daß Isoamylalkohol die Lipoproteide vollständig aus dem Serum entfernt. 2 ml Patientenserum, das mit ASL-Puffer 1 : 25 verdünnt war, wurde mit 2 ml Isoamylalkohol p. A. vermischt. Das Röhrchen mit dem Gemisch wurde verstopft und 1omal in einer Minute über den Stopfen umgedreht. Nach 1ominütigem Stehenlassen wurde es 1o Minuten zentrifugiert bei 4.ooo Umdrehungen. Anschließend wurde mit einem Holzstäbchen der Lipoidkuchen in der Interphase zwischen beiden Flüssigkeiten entfernt. Mit dem Serum wurde nun die oben beschriebene AST-Bestimmung durchgeführt.

Modifizierte Methodik mit Serumvorverdünnung

Um auch mit wenig Serum die Methoden der Lipoidfällung durchführen zu können, wurde die DS- und die Hep-Methode

durch vorherige Serumverdünnung etwas modifiziert. Man benötigt dazu nur o,2 ml Serum, gibt 1,7 ml Phosphatpuffer und o,o2 ml DS und o,1 ml $CaCl_2$ hinzu, letzteres wegen der Genauigkeit am besten mit einer EPPENDORF-Mikroliterpipette. Nach Stehenlassen und Zentrifugieren wurde für den Test noch 1 : 5 verdünnt: o,2 ml Überstand + o,8 ml Puffer = 1 ml 1 : 5o verdünnt. Das gleiche kann man sinngemäß mit Hep. und $MnCl_2$ durchführen.

Für die Iso-Methode braucht man nur o,o5 ml Serum, mit 1,2 ml Phosphatpuffer erhält man die Lösung 1 : 25, zu der man noch 1,25 ml Isoamylalkohol gibt. Nach Zentrifugieren hat man mindestens noch 1 ml. Davon : o,5 ml + o,5 ml Puffer = 1 : 5o.

In Vorversuchen ergaben Vergleiche zwischen den normal verdünnten -wie oben beschrieben- und diesen vorverdünnten Seren keine nennenswerten Abweichungen, so daß sich die Methode bei geringer Menge des zu untersuchenden Materials empfiehlt. Als Beispiel sind einige Seren zum Vergleich in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Vergleich zwischen normaler und modifizierter Methodik

	AST	DS	Hep	Iso
norm.	15o	19o	125	125
vorverd.		125	125	125
norm.	375	19o	19o	19o
vorverd.		19o	19o	19o
norm.	5oo	125	125	125
vorverd.		9o	125	125

Latex-ASL-Reaktion:

Das Latex-ASL-Reagenz (Behringwerke, Marburg) wurde als Objektträgertest entwickelt, um erhöhte AST rasch festzustellen. Es besteht aus einer wässrigen Suspension von Polystyrol-Latex-Partikeln, die mit Streptolysin-O, einem gereinigten Protein-Präparat aus Kulturen von ß-hämolysierenden C-Streptokokken, beladen sind.
Vor Ausführung der Agglutinationsreaktion wird den zu untersuchenden Serumproben ein festgelegtes Volumen Streptolysin-Lösung zugegeben. Die Menge ist so bemessen, daß sie bis 2oo ASE/ml Serum bindet. Bei dem anschließenden Zugeben von Latex-ASL-Reagenz soll daher eine Agglutination nur bei einem Antikörpergehalt von mehr als 2oo ASE/ml Serum auftreten.

Zur Durchführung wurde der Inhalt eines Fläschchens Streptolysin-O in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. o,3 ml dieser Lösung wurden zu o,1 ml unverdünntem inaktiviertem Patientenserum gegeben und das Gemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Ein Tropfen der Mischung wurde mit einem Tropfen Latex-ASL-Reagenz auf einem Objektträger verrührt und nach vier- bis sechsminütigem Rotieren gegen dunklen Untergrund auf Agglutination geprüft.

Ergebnisse

1. Beeinflußt Nahrungsfett die ASR?

Da Lipoide für die unspezifische AST-Erhöhung verantwortlich gemacht werden, interessierte uns in diesem Zusammenhang die Frage, ob vermehrte Zufuhr von Nahrungsfetten bei einer unspezifischen AST-Erhöhung eine Rolle spielt. Es wurden deshalb bei zwei Personen AST-Bestimmungen vor und nach einer fetthaltigen Mahlzeit durchgeführt. Drei Blutproben wurden entnommen und jedesmal mit Lipoidfällung die AST bestimmt. Die erste Bestimmung erfolgte in nüchternem Zustand, die zweite drei Stunden nach der Mahlzeit im Maximum der Lipämie, die dritte nach fünf Stunden während des Abklingens der Lipämie. Diese Seren zeigten makroskopisch eine starke Lipämie. Die Ergebnisse zeigen, daß bei beiden Versuchspersonen kein Anstieg unspezifischer SL-Inhibitoren durch Nahrungsfette erfolgt war. Weder bei den unbehandelten Seren noch nach Anwendung der Lipidfällungsmethoden änderte sich der Titer.

Tabelle 2: Kein Einfluß von Nahrungsfetten auf die ASR

Versuchsperson I	AST	DS	Hep	Iso
nüchtern	9o	9o	9o	6o
nach 3 Stunden	125	9o	9o	45
nach 5 Stunden	125	9o	9o	45
Versuchsperson II				
nüchtern	375	375	19o	19o
nach 3 Stunden	375	375	19o	19o
nach 5 Stunden	375	375	25o	19o

2. Antistreptolysintiterhöhe bei Routineuntersuchungen

Aus den Routineuntersuchungen des rheumaserologischen Labors des Hygiene-Instituts der Universitätskliniken in Homburg wurden 318 eingesandte Patientenseren mit erhöhtem AST ausgewählt. Die Seren waren sämtlich inaktiviert; sie wurden möglichst frisch, einige auch nach zwischenzeitlichem Einfrieren auf - 2o ^{o} untersucht. Vergleichende Tests wurden stets im gleichen Arbeitsgang ausgeführt. Zur Überprüfung des sogenannten Grenztiters wurden aus den Untersuchungen eines Jahres willkürlich Untersuchungsserien von insgesamt 2.5o6 Seren herausgegriffen und ihre Verteilung auf die verschiedenen Titerhöhen in Tabelle 3 dargestellt. Auffällig ist, daß nicht weniger als 46,5 % aller Seren Titer höher als 1 : 2oo aufwiesen, also Titer oberhalb des von den meisten Autoren angegebenen Grenzwertes der Norm zeigten. 26 % zeigten Werte zwischen 2o1

und 4oo ASE, 14,6 % mehr als 4oo ASE. Titer von 2oo - 4oo ASE betrachteten wir als krankheitsverdächtig und würden bei ihnen grundsätzlich eine zweite Bestimmung durchführen. Da eine Verfolgung des Titerablaufes in der Regel nicht möglich ist, kommt man um die Beurteilung von Einzeltitern nicht herum. Titerhöhen über 4oo ASE sehen wir als sicher pathologisch an. Wir folgen dabei dem Vorschlag von KLEIN u.a. (1971), die Normgrenze so festzulegen, daß nicht mehr als 15 % der gefundenen AST darüberliegen. Die Titerhöhen ließen keine jahreszeitlichen Schwankungen erkennen. Wie schon bei CHRIST (1961) beschrieben, können die Titer nach einer akuten Polyarthritis gefolgten Angina und wohl auch nach unkomplizierten Streptokokkeninfektionen bis zu einem Jahr und in Ausnahmefällen noch länger über der von den meisten Autoren als Norm angesehenen Grenze von 2oo ASE bleiben.

Tabelle 3: Höhe der AST bei serologischen Routine-untersuchungen

	Zahl der Serumproben					
Untersuchungstage	<100 ASE	101 -200	201 -400	401 -800	>800	Summe
4.1.71	12	13	11	8	2	46
11.1.71	61	30	33	20	4	148
18.1.71	39	39	41	22	11	152
1.2.71	52	47	18	5	1	123
8.2.71	40	48	37	7	2	134
2.3.71	43	59	21	4	1	128
15.3.71	30	57	20	2	0	109
5.4.71	24	42	39	12	1	118
13.4.71	29	21	17	6	3	76
3.5.71	39	54	29	15	8	145
17.5.71	33	48	40	10	0	131
2.6.71	15	28	41	20	3	107
28.6.71	22	38	36	10	0	106
5.7.71	48	40	31	7	1	127
19.7.71	16	40	47	8	6	117
9.8.71	21	34	29	13	11	108
30.8.71	22	27	31	28	19	127
7.9.71	13	41	35	18	6	113
13.9.71	24	30	27	20	22	123
9.2.72	14	16	13	4	1	48
16.2.72	11	12	16	2	0	41
21.2.72	22	33	6	2	0	63
8.3.72	7	25	17	12	4	65
15.3.72	11	22	13	4	1	51
Summe	648	844	648	259	107	2.506
%	25,9	33,6	25,9	10,3	4,3	100

Vergleich der drei Lipoid-Fällungsmethoden

Das besondere Interesse galt dem Vergleich der drei verschiedenen Methoden zur Lipoideliminierung. Bei 191 Seren wurden parallel zur ASR drei Methoden der Lipoidfällung angewandt, die Methoden mit DS, Hep. und Iso. Wenn man eine Schwankungsbreite von o,5 Titerstufen als Fehlerbreite zuläßt, so zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung der mit den verschiedenen Methoden erzielten Ergebnisse.

Tabelle 4: Methodenvergleich

Methoden	Serumproben
Gleichheit aller drei Methoden innerhalb o,5 Titerstufen Schwankungsbreite	169
Differenz ≥ 1 Titerstufe	22
Davon: Differenz größer bei DS	2
Hep	5
Iso	7
DS + Hep	1
DS + Iso	1
Hep + Iso	6
insgesamt	191

Insgesamt 22 Patientenseren zeigten eine Differenz, die eine oder mehr Titerstufen betrug. Die Titersenkungen waren bei Iso etwas häufiger bzw. stärker als bei den

anderen Methoden. Viermal kam es bei den 191 Seren zu einer Titererhöhung nach der Lipoidfällung, davon zweimal bei allen drei Methoden.

AST und Lipoidfällung bei verschiedenen Krankheitsgruppen

Um die Methoden der Lipoidentfernung besser differentialdiagnostisch nützen zu können, wurde -soweit möglich- eine Einteilung in Krankheitsgruppen vorgenommen. Das Hauptaugenmerk galt Krankheitsfällen, bei denen eine Infektion mit Streptokokken eine ätiologisch bedeutsame Rolle spielt (Angina, Erysipel, chronische Tonsillitis), insgesamt 11 Seren. Nicht sicher streptokokkenbedingte Krankheitsbilder bilden eine weitere Gruppe, hierzu zählten auch Myocarditiden, Glomerulonephritiden und Fälle von unklarer BSG und unklarem Fieber (36 Seren). Da schon lange die unspezifische AST-Erhöhung bei Hepatitiden bekannt ist (s.o.), war es aufschlußreich, auch hier die Titer nach Entfernung der Lipoide zu untersuchen, 16 Seren konnten getestet werden. Sonstige Diagnosen, bei denen keine direkte Indikationsstellung zum AST vorlag, bilden eine weitere Gruppe von 64 Seren. Leider war bei den eingesandten Seren nicht immer die Diagnose angegeben und auch oft nicht ausfindig zu machen, so daß diese Seren mit unbekannter Diagnose die letzte Gruppe bilden von ebenfalls 64 Seren. Vor Lipoidfällung lagen alle Seren höher als 1 : 2oo. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse in

den verschiedenen Krankheitsgruppen.

Tabelle 5:

Aufgliederung nach Krankheitsgruppen

1	2	3	4	5	6	7	8
	Streptokokkenbedingte Erkrankungen	streptokokkenfragliche Erkrankungen	Hepatitis	sonstige	unbekannte	Summe	%
Zahl insges.	11	36	16	64	64	191	1oo
AST <4oo	o	2o	5	41	47	113	59
AST >4oo	11	16	11	23	17	78	41
AST n. DS <2oo	o	21	9	47	47	124	65
AST n. DS >2oo	11	15	7	17	17	67	35
AST n. Hep <2oo	o	22	13	52	5o	137	72
AST n. Hep >2oo	11	14	3	12	14	54	28
AST n. Iso <2oo	o	26	15	51	54	146	76,5
AST n. Iso >2oo	11	1o	1	13	1o	45	23,5
mittl. Abfall 1	3	2o	3	37	39	1o2	53,4
mittl. Abfall 1,5 - 2	8	12	5	22	19	66	34,5
mittl. Abfall >2,o	o	4	8	5	6	23	12

Die Seren von gesicherten Streptokokken-Erkrankungen, die primär alle mehr als 4oo ASE enthielten, zeigten nach keiner der drei Lipoidfällungsmethoden einen Abfall auf Werte unter 2oo ASE. Dieser Wert wird bezüglich der mit DS behandelten Seren von LEGLER (1969) als Normgrenze angegeben; auf Grund unserer Erfahrungen wollen wir uns diesem anschließen. Auf der anderen Seite sah man bei 13 der 16 Hepatitisseren eine mittelstarke bis starke Absenkung der ASR nach Lipoidfällung. Nur wenige Seren (nach Iso nur ein Serum) blieben in ihrem Titer oberhalb von 2oo ASE. Dies zeigt deutlich den Wert der Lipoidfällung für die Bewertung der ASR. Von den 36 Patienten mit fraglicher Streptokokken-Erkrankung hatten 2o von vornherein nur einen schwach erhöhten AST. Der größere Teil der Seren dieser Gruppe zeigte sich als recht stabil in ihrem Titer mit nur geringem Abfall der Lipoidfällung, was einen starken Hinweis auf die Streptokokken-Ätiologie bei einem Teil dieser Fälle erlauben dürfte.

Aussagekraft der Latex-ASL-Reaktion

Mit dem Latex-ASL-Reagenz wurden insgesamt 127 Seren untersucht. Parallel dazu wurde der AST bestimmt um die Lipoidentfernung nach der DS-Methode durchzuführen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Vergleich zwischen Latex-ASL, ASR und ASR nach DS

Latex-ASL	Anzahl	AST		AST nach DS	
		<200	>200	<100	>100
negativ	68	11	57	20	48
positiv	59	2	57	0	59
		<300	>300	<150	>150
negativ	68	31	37	51	17
positiv	59	5	54	5	54
		<400	>400	<200	>200
negativ	68	38	30	59	9
positiv	59	12	47	16	43

Eine Korrelation zwischen den beiden Untersuchungsmethoden ist zweifellos vorhanden. Jedoch fanden sich sowohl Seren, die im Latex-ASL-Test negativ reagierten und doch erhöhte AST aufwiesen, wie solche, die trotz positiver Latex-ASL-Tests keine erhöhte AST zeigten. Die Anzahl falsch negativer bzw. falsch positiver ASL-Latexbefunde ist naturgemäß unterschiedlich, je nachdem, ob man die Grenze für erhöhte AST bei 200, 300 oder 400 ASE annimmt (s. Tabelle 6). Bei dem Grenztiter 200 gibt es nach DS keine falsch positiven Titerwerte. Bei einem Grenzwert von 300 stieg die Zahl der falsch positiven Seren an und wird erheblich groß bei dem Grenzwert 400, wobei immer noch 30 (nach DS: 9) falsch negative Reaktionen verzeichnet wurden.

Diskussion

Die Analyse der AST-Höhen unserer Routineuntersuchungen weist auf die bekannte Problematik hin, Titerhöhen verschiedener Laboratorien miteinander zu vergleichen. Trotz Umrechnung auf den internationalen Standard liegen unsere AST höher als die der meisten anderen Laboratorien. Dies mag wenigstens teilweise an der Verwendung des Streptolysins der Behringwerke liegen, das nach den Beobachtungen von KLEIN u.a. (197o) im Mittel höhere AST liefert als ein vergleichsweise verwendetes Reagens von Difco. Eine vorsichtige Bewertung, wobei nur Titer oberhalb von 1 : 4oo -oder besser nach Lipoidfällung ab 1 : 2oo- als sicher pathologisch zu betrachten sind, scheint uns bezüglich unseres Untersuchungsgutes angebracht zu sein. Als entscheidend für die unspezifische AST-Erhöhung bei Hepatitis, Nephrose, Leukämie, bakterieller Verunreinigung und Lipämie werden unspezifische Hemmungen des SL angesehen (LEGLER, 1969). Als Ursache dieses unspezifischen Inhibitorsystems nimmt man Verschiebungen im Lipid-Proteinsystem der Lipoproteide an. KINDLER (197o), PETERSEN und Mitarbeiter (1966) haben wesentliches zur Erkennung des Wirkungsmechanismus der SL-Inhibitoren beigetragen. Das Streptolysin O kann sowohl mit der C_3-Hydroxylgruppe des Cholesterins der Erythrozytenmembran als auch mit den freien Hydroxylgruppen des Serumcholesterins reagieren. Hierdurch steigt der Verbrauch an Streptolysin O und führt somit zwangsläufig zu falsch positiven AST-Erhöhungen. Phosphatide können die Wirksamkeit des Cholesterins noch erheblich steigern. Sie wirken wahrscheinlich als Lösungsvermittler und erhöhen

die Zahl der zur Reaktion mit SL fähigen freien Hydroxylgruppen. Nahrungsfett scheint die Höhe der ASR nicht zu beeinflussen (s. Tab. 2). Es ist daher nicht unbedingt erforderlich, das Blut von den Patienten in nüchternem Zustand zu entnehmen.

Bei den Lipoproteid-Ausfällungen durch Poly-Anionen in Gegenwart bivalenter Kationen (DS, Hep) werden die ß-Lipoproteide insgesamt und die α_1-Lipoproteide teilweise aus dem Serum eliminiert. Der Vergleich dieser beiden Methoden zeigt weitgehende Übereinstimmung. In fast allen Fällen war ein Abfall des mit diesen Methoden bestimmten AST gegenüber dem gleichzeitig bestimmten normalen AST festzustellen (Tabelle 4). Nachdem TICHY 1961 die Brauchbarkeit des Albuminverfahrens nach CABAU und BADIN dargelegt hatte, stellte LEGLER Vergleichsuntersuchungen mit dem Albumin- und DS-Verfahren an. Diese zeigten eine erheblich stärkere AST-Absenkung nach DS-Zusatz als nach Albuminzugabe. Inzwischen hat sich die DS-Methode auch praktisch im Routinelaboratorium bewährt. Da bei einem Vergleich mit ihr die Hep-Methode nicht schlechter ausfällt, ist diese als gleichwertig zu betrachten. Es bleibt abzuwarten, ob mit anderen Substanzen, die auch als Poly-Anionen angesehen werden, der gleiche Effekt zu erzielen ist. BADIN und BARILLEC geben an, daß mit ihrer Methode der Eliminierung durch Isoamylalkohol die Lipoproteide vollständig entfernt werden. Der Vergleich mit den beiden anderen Methoden zeigt auch hier weitgehende Übereinstim-

mung. Betrachtet man die insgesamt 22 Fälle, in denen die drei Methoden nicht übereinstimmen, so fällt auf, daß hier die Iso-Methode in sieben Fällen den größten Abfall zeigt (Tabelle 4). Es ist möglich, daß diese größere Titersenkung auf einer vollständigeren Lipoproteidentfernung beruht.

Die Betrachtung der Patienten mit verschiedenen Krankheitsgruppen (Tabelle 5) illustriert zunächst die Wichtigkeit der Lipoidfällung zur Beurteilung der ASR. Die Gruppe der Patienten mit sicher streptokokkenbedingter Erkrankung einerseits und mit Hepatitis andererseits zeigt markante Unterschiede. Der AST sank bei dem größten Teil der Hepatitisseren, jedoch bei keinem der Seren von Streptokokken-Patienten nach Lipoidfällung auf Normalwerte ab. Immerhin ist es jedoch bemerkenswert, daß auch in der ersten Gruppe 8 der 11 Seren einen mittelstarken Titerabfall nach Lipoidfällung zeigten und bei den Hepatitisseren 3 von 16 nur einen schwachen Abfall. Die von BADIN & BARILLEC (1969) angegebenen "1oo %-Ergebnisse" mit der Iso-Methode bei Streptokokken- bzw. Hepatitis-Patienten sind ohne vorherige Auswahl von Patienten bzw. Seren nicht denkbar. Dennoch wird man bei Patienten mit fraglicher Streptokokken-Erkrankung (Tabelle 5, Spalte 3) aus der Höhe des AST nach Lipoidfällung diagnostische Schlüsse ziehen dürfen.

Die Patienten mit sicher streptokokkenbedingten Erkrankungen zeigten überhaupt keinen Abfall unter 2oo ASE nach

Lipoidfällung (Tabelle 5, Spalte 2). Auffallend hierbei ist der gleiche Befund bei allen drei Methoden. Bei den Krankheitsbildern mit nicht sicher streptokokkenbedingter Genese war das Bild recht unterschiedlich (Tabelle 5, Spalte 3). In dieser Krankheitsgruppe ist die ASR als diagnostisches Hilfsmittel besonders wichtig. Von 16 Hepatitis-Patienten zeigten 13 eine mittelstarke bis starke Absenkung der AST nach Lipoidfällung; nur wenige Seren (nach Iso nur ein Serum) blieben in ihrem Titer oberhalb des Normbereiches von 2oo ASE (Tabelle 5, Spalte 4). Beim Vergleich der verschiedenen Methoden zeigt die Iso-Methode hier einen deutlichen Vorsprung; die absolute Zahl der Titersenkungen ist bei ihr am größten. Außerdem empfiehlt sie sich noch durch ihre verhältnismäßig rasche und einfache Anwendung. Der starke Titerabfall bei den meisten Hepatitisseren ist nicht unerwartet. Da die Leber im Lipoproteidstoffwechsel eine zentrale Stellung einnimmt, ist es denkbar, daß es bei einer Hepatitis mit ihren Einschränkungen von Leberfunktionen zu einer qualitativen Störung in der Lipoid-Protein-Bindung kommt. Verschiebungen im Lipoid-Protein-System wirken wiederum inhibitorisch auf die enzymatische Aktivität des SL und bedingen somit unspezifisch hohe AST. Bei der Eliminierung dieser unspezifischen SL-Inhibitoren zeigte die Iso-Methode ihre größte Wirksamkeit; von 11 deutlich erhöhten Hepatitisseren lag nach der Iso-Methode nur noch eins über 2oo ASE (Tabelle 5, Spalte 4).

Bei der Latex-ASL-Reaktion ist theoretisch nicht zu erwarten, daß sie durch Lipoide beeinflußt wird. Dieser Test ist als Suchreaktion gedacht, um Seren mit erhöhter ASR auszusondern. Diese sollen dann im regulären Antistreptolysintest nachuntersucht werden, während die im Latextest negativen Seren Titer unter 1 : 2oo haben sollen und daher nicht weiter untersucht zu werden brauchen (ECKARDT & MAI, 197o). MATHIES und GAEDICKE haben 1968 gezeigt, daß die Latex-ASL-Reaktion im Falle eines negativen Ergebnisses eine relativ sichere Aussage darüber erlauben soll, daß keine Titer oberhalb der Normgrenze vorliegen. Bei Seren mit negativem Latex-ASL-Test, deren AST über der Norm lag, zeigten MEIGEL und DEINDL (1969), daß nach Lipoidfällung der AST im Normbereich lag. Unsere Untersuchungen, die in Tabelle 6 dargestellt sind, widersprechen dem. Von den in unserer Untersuchung 68 Seren mit negativ ausgefallenen Latextests gab es nach DS-Behandlung immer noch 9 Seren, die über 2oo ASE lagen. Dieses Ergebnis rät zu Vorsicht bei diagnostischen Aussagen. Da eine Verfolgung des Titerablaufes in der Regel nicht möglich ist, muß man sich an die Beurteilung von Einzeltitern halten und somit kann die Latex-ASL-Reaktion unseres Erachtens nicht als Schnelltest zur Erkennung von Seren mit erhöhter ASR empfohlen werden. Nicht nur, daß man positive Seren ohnehin mit der konventionellen ASR nachuntersuchen muß (MATTHIES & GAEDICKE, 1968); auch falsch negative Latex-ASL-Reaktionen kommen nicht ganz selten vor (s. Tab. 6). Über ihr Vorkommen wurde auch von anderer Seite be-

richtet (WINTERHOFF 1969, KLEIN u.a., 1971).

Ein Vorteil des Latex-ASL-Testes könnte darin liegen, daß eine Beeinflussung durch die Serumlipoide nicht zu erwarten ist. WINTERHOFF (1969) sowie MEIGEL und DEINDL (1969) berichteten darüber, daß Seren mit erhöhtem AST und negativem Latextest nach Lipoidfällung meist normale AST aufwiesen. Doch gibt es auch hierbei Ausnahmen (WINTERHOFF 1969, sowie Tab. 6).

Zusammenfassung

Drei Methoden zur Ausfällung von ß-Lipoproteiden im Serum (Dextransulfat -$CaCl_2$, Heparin-$MnCl_2$, Isoamylalkohol) waren hinsichtlich der Beseitigung unspezifischer, die Antistreptolysin-Reaktion störender Faktoren etwa gleich gut wirksam. Die Antistreptolysintiter wurden bei Seren von Patienten mit Hepatitis meist auf Normalwerte abgesenkt, während sie bei Patienten mit streptokokkenbedingter Erkrankung erhöht blieben. Alimentär aufgenommenes Fett beeinflußte die Antistreptolysin-Reaktion nicht. Der Latex-ASL-Test kann wegen des Vorkommens falsch positiver und falsch negativer Reaktionen als Schnelltest nicht empfohlen werden. Eine Unterscheidung spezifisch und unspezifisch erhöhter Antistreptolysin-Reaktionen ist damit ebenfalls nicht mit Sicherheit möglich.

Literatur

1. BADIN, J. & BARILLEC, A.: Dosage spécifique de l'antistreptolysine O sérique après élimination des lipoprotéines par l'alcool isoamylique
Ann. Biol. Clin. 27, (1969): 395 - 402

2. BURSTEIN, M. & SAMAILLE, J.: Sur une nouvelle méthode de dosage des ß-lipoprotéines du sérum
Pathol. Biol. 6, (1958): 541 - 549

3. CABAU, N. & BADIN, J.: Etude de l'inhibition non spécifique de la streptolysine O. II. Affaiblissement électif du pouvoir inhibiteur par une globuline α-1 présente dans la fraction V de Cohn
Ann. Inst. Pasteur 1oo, (1961): 765 - 776

4. CHRIST, P.: Serologische Reaktionen beim akuten und chronischen Gelenkrheumatismus und ihre klinische Bedeutung
Klin. Wschr. 39, (1961): 1.o97 - 1.112

5. ECKHARDT, R. & MAI, K.: ASL-Latex-Test und Antistreptolysingehalt menschlicher Seren
Klin. Wschr. 48, (197o): 295 - 297

6. K I N D L E R , U.: Die klinische Wertigkeit einer modifizierten Antistreptolysinreaktion DMW 95, (197o) 2.115 - 2.118

7. K L E I N , G.C., B A K E R , C.N. & J O N E S , W.L.: "Upper limits of normal" antistreptolysin O and antideoxyribonnclease titers Appl. Microbiol. 21, (1971): 999 - 1.oo1

8. K L E I N , G.C., B A K E R , C.N. & M O O D Y , M.D.: Comparison of antistreptolysin O latex screening test with the antistreptolysin O hemolytic test Appl. Microbiol. 19, (197o): 6o - 61

9. K Ö H L E R , W.: Die Serologie des Rheumatismus und der Streptokokkeninfektion 3. Aufl. J.A. Barth, Leipzig 1963

1o. L E G L E R , F.: Die Bewertung des Antistreptolysintiters bei Anwendung der Dextransulfat-Methode Z. Immunitätsfg. 138, (1969): 161 - 168

11. M A N N , J.F., R O S S E N , R.D., L E H R I C H , J.R. & K A S E L , J.A.: The effect of kaolin on immunoglobulins: an improved technique to remove the nonspecific serum inhibitors of reovirus hemagglutination Journ. Immun. 98, (1967): 1.136 - 1.142

12. M A T H I E S , H. & G A E D I C K E , H.: Die Latex-ASL-Reaktion zur groben Differenzierung normaler und pathologischer AST
Med. Klin. 63, (1968): 165 - 167

13. M E I G E L , W. und D E I N D L , G.: Der Latex-ASL-Test: Erfahrungen mit einer Objektträgerschnellmethode zur raschen Abgrenzung überhöhter Antistreptolysintiter
Münch. med. Wschr. 111, (1969): 198 - 202

14. O K E R - B L O M , N. N I K K I L Ä , E. & K A L A J A , T.: Non-specific antistreptolysin reaction in hepatitis sera. Antistreptolysin titers before and after removal of lipids from the hepatitis sera with bentonite
Ann. Med. exp. Fenn. 28, (1950): 125 - 134

15. PA C K A L É N , T.: Non-specific antistreptolysin reactions and serum (or pleura exsudate) cholesterol
J. Bact. 56, (1948): 143 - 156

16. P E T E R S E N , K.F.: Die Serodiagnose der Streptokokken-Infektionen und ihrer Folgekrankheiten Med. Klin. 59, (1964): 8o8 - 812

17. P E T E R S E N , K.F., N O W A K , P., T H I E L E , O.W. & U R B A S C H E K , B.: Investigations concerning the action of streptolysin O and its unpecific inhibition by lipids. Int. Arch. Allergy 29, (1966): 69 - 81

18. R O T H B A R D , S., W A T S O N , R.F., S W I F T , H.F. & W I L S O N , A.T.: Bacteriologic and immunologic studies on patients with hemolytic streptococcal infections as related to rheumatic fever Arch. Int. Med. 82, (1948): 229 - 25o

19. R U D O L P H , F.: Unspezifisch erhöhte Antistreptolysintiter in bakteriell infizierten Seren Z. Immunforsch. 124, (1962): 249 - 268

2o. S C H E I F F A R T H , F., L E G L E R , F., F R E N G E R , W. & T R I P P E , K.: Ergebnisse der Antistreptolysinreaktion bei Streptokokkeninfektionen und anderen Erkrankungen Z. Hyg. 15o, (1964): 151 - 162

21. S T Ö R I K O , K.: Serologische Reaktionen zur Diagnose rheumatischer Krankheiten Laboratoriumsblätter für die medizin. Diagnostik (Behringwerke) Nr. 2 (197o)

22. T E I C H M A N N , W.: Über die Ergebnisse der Antistreptolysinreaktion bei Hepatitis epidemica
Ärztl. Lab. 2, (1956): 353 - 355

23. T I C H Y , H.: Die Trennung spezifischer und unspezifischer Antistreptolysintiter mit der Albumin-Methode des Institut Pasteur
Z. Rheumaforsch. 2o, (1961): 21 - 26

24. T O D D , E.W.: Antigenic streptococcal hemolysin
J. Exper. Med. 55, (1932): 267 - 28o

25. T O D D , E.W.: Antihemolysin titres in hemolytic streptococcal infections and their significance in rheumatic fever
Brit. J. exp. Path. 13, (1932): 248 - 259

26. W I N B L A D , S.: Studies on non-specific antistreptolysin O titre. 1. The influence of serum ß-lipoproteins on the non-specific antistreptolysin O titre.
Acta path. microbiol. Scand. 66, (1966): 93 - 1o4

27. W I N T E R H O F F , D.: Latex-Antistreptolysin-Reaktion zur quantitativen Bestimmung von Streptokokken-Antikörpern
Z. Immunitätsforschg. 137, (1969): 417 - 42o

Herrn Professor Dr. R. Wigand danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die ständige Beratung und Hilfe.

Herrn Professor Dr. P. G. Scheurlen danke ich dafür, daß ich das Krankenblattarchiv der Medizinischen Universitätsklinik benutzen durfte.

Lebenslauf

Am 15. Juni 1945 wurde ich als Sohn des damaligen Reichsbahnoberinspektors Augustinus Mohm und seiner Ehefrau Helene geb. Beinhorn in Dobrigau, Kreis Tirschenreuth/Bayern geboren. Meine Eltern waren während des Krieges dorthin aus Saarbrücken evakuiert worden.

Von Herbst 1951 bis 1955 besuchte ich die Katholische Rotenbergschule in Saarbrücken bis zum Eintritt in die Sexta des Staatlichen Ludwigsgymnasiums in Saarbrücken. Dort legte ich am 5.3.66 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes. Am 24.7.68 bestand ich dort das Vorphysikum, am 3.4.7o das Physikum. Nach 11 Fachsemestern beendete ich das Studium mit der Ärztlichen Prüfung zum Frühjahrstermin 1973.